

### РАЗДЕЛ III. Дисфункция эндотелия в клинической практике

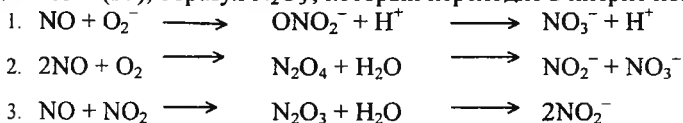
#### МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ $\text{NO}_3^-$ И $\text{NO}_2^-$ С ПОМОЩЬЮ ЦИНКОВОЙ ПЫЛИ В ПРИСУТСТВИИ АММИАЧНОГО КОМПЛЕКСА СУЛЬФАТА МЕДИ

Веремей И.С., Солодков А.П., Осочук С.С., Деюн Г.В., Дубровская А.В.

*ЦНИЛ Витебского государственного медицинского университета, Витебск*

В связи с участием эндотелиального релаксирующего фактора – оксида азота (NO) во многих физиологических процессах в организме представляет значительный научно-практический интерес определение NO в биологических жидкостях. Прямые методы измерения молярной концентрации NO очень сложны и требуют дорогостоящего оборудования, в то время как количественная оценка продуктов превращения NO (нитратов и нитритов) доступна и может быть использована в клинической практике.

В организме NO реагирует с супероксидным радикалом, образуя пероксинитрит, который быстро превращается в нитрат ион (1), или окисляется кислородом до оксида азота (IV), который в водной среде диспропорционирует до нитратов и нитритов (2). Кроме того, NO реагирует с оксидом азота (IV), образуя  $\text{N}_2\text{O}_3$ , который переходит в нитрит ионы (3).



Спектроскопические методы определения нитратов можно разделить на 4 группы [3]: (1) методы, основанные на нитровании органических соединений, особенно фенолов; (2) метод, основанный на поглощении нитратов в УФ области; (3) методы, основанные на окислении органических соединений, например бруцина; (4) методы, основанные на восстановлении нитратов до нитритов с последующим определением последнего реактивом Грисса. Определение нитратов, основанное на нитровании фенолов и фенолдисульфокислот и окислении органических соединений, малочувствительно и требует специальной подготовки пробы [1]. Метод, основанный на собственном поглощении нитратов и нитритов в УФ диапазоне, практически не применяется из-за низкой чувствительности (90 мг/л  $\text{NO}_3^-$  и 20 мг/л  $\text{NO}_2^-$ ) и мешающего влияния большого числа органических соединений [3]. Для определения нитритов известно

значительно больше простых, надежных и чувствительных методов определения, чем для определения нитратов. В связи с этим предложен ряд способов восстановления нитрата до нитрита: металлическим кадмием [2], цинковой пылью [1], нитратредуктазой [4].

Металлический кадмий в чистом виде не дает удовлетворительной конверсии  $\text{NO}_3^-$  в  $\text{NO}_2^-$ . С целью достижения достаточного и стабильного восстановления  $\text{NO}_3^-$  в  $\text{NO}_2^-$  металлический кадмий химически модифицируют или  $\text{HgCl}_2$  для получения ртутной амальгамы [1], или для образования «омедненного» кадмия – солями двухвалентной меди [5, 2].

Среди восстановителей, приемлемых для конверсии нитратов в нитриты ( $\text{NO}_3^-$  в  $\text{NO}_2^-$ ), довольно часто применяется цинковая пыль [3]. Однако, используя колонки, заполненные цинковой пылью, в качестве восстановителя  $\text{NO}_3^-$  в  $\text{NO}_2^-$ , очень трудно получить воспроизводимые результаты. В ряде работ показано, что в восстановительных колонках гальванические пары  $\text{Zn/Hg}$  и  $\text{Zn/Cu}$  в диапазоне pH (2-9) восстанавливают нитрат до ионов аммония [2]. Кроме того, общим недостатком цинковых восстановителей являются неудовлетворительные гидродинамические характеристики колонки: скорость протекания раствора через них быстро убывает вследствие засорения восстановителя продуктами окисления цинка [2]. Нами было обнаружено, что при использовании однократной навески цинковой пыли в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди при pH = 9.6 конверсия нитратов в нитриты оказалась стабильной и составила  $60 \pm 4\%$ . В связи с этим целью нашей работы было подобрать оптимальные условия подготовки пробы.

Нитрит натрия и нитрат калия очищали перекристаллизацией. Для удаления нитритов, раствор нитрата калия нагревали в присутствии сульфаниловой кислоты и перекристаллизовывали добавлением этанола. Стандартные растворы  $\text{NaNO}_2$  и  $\text{KNO}_3$  готовили из навески. Оптическую плотность азокрасителя, образовавшегося путем взаимодействия нитрит-иона с реактивом Грисса, измеряли на спектрофотометре СФ-46. В исследовании использовали реактивы марки х.ч., ч.д.а.

Конверсию нитратов в нитриты осуществляли в пластиковых пробирках. К 1 мл стандартного раствора нитрата калия добавляли 0,18 г цинковой пыли, 0.5 мл аммиачного буфера (pH=9.6), 20 мкл аммиачного комплекса сульфата меди. Пробирки встряхивали в течение 30 минут на комбинированном встряхивателе, который обеспечивал равномерное распределение цинковой пыли в объеме пробы. Цинковую пыль осаждали центрифугированием. К супернатанту прибавляли реактив Грисса и измеряли оптическую плотность при 520 нм. Калибровочный график для определения нитратов строили в диапазоне концентраций от 20 до 100 мкМ по 5 точкам в триплете. В данном методе имела место тесная корреляция ( $R^2=0.996$ ) между

концентрацией нитратов и оптической плотностью. Конверсия в присутствии аммиачного комплекса меди оказалась стабильной и составила  $60 \pm 4\%$ , в то время как в его отсутствие наблюдали значительный разброс данных — 33–79%.

Для определения  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NO}_2^-$  в плазме крови необходим этап депротеинизации. Наиболее адекватным способом [4] депротеинизации плазмы является ультрацентрифугирование с последующей ультрафильтрацией супернатанта, что не всегда доступно каждой лаборатории, поэтому мы провели сравнительное исследование влияния различных депротеинизирующих агентов на конверсию нитратов в нитриты. Для депротеинизации плазмы крови мы использовали 20% раствор ТХУ (в соотношении 1:1 к плазме), 1 М раствор сульфосалициловой кислоты (в соотношении 1:10 к плазме), ацетонитрил (в соотношении 1:2 к плазме), 96% этанол (в соотношении 1:2 к плазме), 10% раствор вольфрамовой кислоты (в соотношении 1:1 к плазме), 6% раствор цинка сульфата (в соотношении 1:1 к плазме). Оптимальным депротеинизирующим агентом для данного метода является 6% раствор цинка сульфата, избыток которого удаляется из супернатанта добавлением раствора NaOH. Ацетонитрил, этанол сульфосалициловая кислота, вольфрамовая кислота подавляют количественное восстановление нитратов в нитриты.

Чувствительность метода, рассчитанная с учетом разбавления при депротеинизации, составила 5,46 мкМ. Следует отметить, что зависимость между концентрацией нитратов и оптической плотностью линейная, а, следовательно, и предел обнаружения в значительной степени зависит от чистоты реактивов. Воспроизводимость и правильность методики оценивали методом добавок при разных концентрациях ( $\text{Sr} < 0.07$ ).

Нами проведена количественная оценка концентрации нитратов и нитритов в плазме крови доноров мужчин ( $n = 12$ ) и женщин ( $n = 6$ ). Депротеинизацию плазмы проводили добавлением 6% раствора цинка сульфата в соотношении 1:1 к объему плазмы, центрифугировали, к 1 мл супернатанта добавляли эквивалентное количество NaOH и вновь центрифугировали. К 1 мл надосадочной жидкости добавляли 0,18 г цинковой пыли, 0,5 мл аммиачного буфера ( $\text{pH} = 9.6$ ), 20 мкл аммиачного комплекса сульфата меди. Пробирки встряхивали в течение 30 минут на комбинированном встряхивателе, который обеспечивал равномерное распределение цинковой пыли в объеме пробы. Цинковую пыль осаждали центрифугированием. К 1 мл собранной пробы прибавляли 1 мл раствора сульфаниловой кислоты и оставляли в холодильнике на 10 мин до завершения реакции диазотирования. Затем к каждой пробе прибавляли по 1 мл раствора ацетата натрия и  $\alpha$ -нафтиламина. Спустя 30 мин измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 520 нм. Суммарное

содержание  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  у мужчин составило  $18,58 \pm 0,54$  мкМ и у женщин –  $21,60 \pm 2,57$  мкМ.

Таким образом, благодаря своей доступности и простоте аппаратного оформления данный метод может применяться для определения нитратов в биологических жидкостях в экспериментальной и клинической практике.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бабко А.К., Пилипенко А.Т. Фотометрический анализ. Методы определения неметаллов. - Москва, 1974. - 360 с.
2. Никоноров В.В., Белянская Т.А. Сравнительное изучение способов гетерогенного восстановления нитрат-ионов // Журнал аналитической химии. - 2000. - Т. 55. №2. - С.133-137.
3. Уильямс У.Дж. Определение анионов. - Москва, 1982. - 624 с.
4. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. - 1982. - Vol. 126. - P. 131-138.
5. Raymond S. Lambert and Ronald J. DuBois. Spectrofotometric determination of nitrate in the presence of chloride // Anal. chem. - 1971. - Vol. 43, №7. - P. 955-957.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАВИСИМОЙ ОТ ОКСИДА АЗОТА ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ У ДЕТЕЙ С ПИЕЛОНЕФРИТАМИ

Вильчук К.У.

*Государственный медицинский университет, Гродно*

### **Введение**

По уровню кровообращения почка занимает одно из ведущих мест в организме. Недоучет в патогенезе пиелонефритов нарушений этого звена функционирования почек – одна из главных причин неудач при лечении данной категории больных.

В реализации вазоактивных эффектов сосудов почек в норме и при патологии активно дискутируется роль оксида азота (NO) (Марков Х.М., 1996). Известно, что NO образуется не только в эндотелии, миоцитах сосудов, но и в мезангиальных, эпителиальных канальцевых клетках почек. Регулируя тонус афферентных и эфферентных артериол, NO модулирует скорость клубочковой фильтрации, корковый и медуллярный кровоток,